

## A fekete-rozsdával (*Puccinia graminis* var. *tritici*) fertőzött búza terminális oxidációjának vizsgálata

KIRÁLY ZOLTÁN és FARKAS GÁBOR

Magyar Tudományos Akadémia Mezőgazdasági Kutató Intézete, Martonvásár

Warburg munkáiban [28, 29] ismételtelen rámutatott arra, hogy a neoplasztikus és más károsodott emberi és állati szövetekben a szénhidrátbontás normális útjai megváltoznak. Újabban sikerült kimutatnunk [6, 13], hogy a légzés közbeeső szakaszainak mechanizmusa a beteg növényekben is hasonló módon megváltozhat. A kísérletek alapján kiderült, hogy a trikarbonsav-ciklus működése — amely az egészséges szövetekben a respiráció fő reakció-útjának tekinthető — a fertőzött növényekben háttérbe szorul. Ennek ellenére a légzés erőssége a beteg szövetekben rendkívülien megnövekszik. E jelenség valószínű magyarázatára szolgált az a teória, amely szerint a piroszólósav az aerob fermentáció útvonalába kényszerül [2, 6]. Ezt az elgondolást támogatja az a tapasztalat, hogy a beteg levelek  $O_2$ -felvétele (feltehetően az aerob fermentációra való áttérés miatt) nem fokozható 2,4-DNP-kezeléssel, éles ellentétben azzal a nagy respiráció-fokozással, amely a DNP-al kezelt egészséges szövetek esetében következik be [1, 14]. (A dinitrofenol-hatásra nézve lásd [4, 23 24].)

A növényekben a fermentáció végtermékeinek (alkohol, tejsav) oxidációja az aszkorbinsavoxidáz közvetítésével mehet végbe [9, 10]. Ez utóbbi tény felvetette a fertőzött növényi szövetekben található végoxidázok természetének problémáját.

Itt vázolt vizsgálataink egy másik, általános fontosságú kérdést is érintenek. A terminális oxidázok variabilitását számos szerző, különböző szempontokból vitatta az elmúlt években. A szerzők többsége azon a véleményen van, hogy a növény fejlődésének korai szakaszában a terminális oxidázként funkcionáló citokró-m-rendszert más rendszerek helyettesítik, amikor a növény éretté válik [7, 15, 16]. Hill és Hartree [8] azonban alaposan kritizálta ezt az elgondolást. Többek között nagyon valószínűtlennek tartják, hogy a végoxidázok néhány napon belül megváltozzanak, mint ahogy ezt az egyes szerzők gondolják [15, 16].

Alábbi kísérleteink azzal a problémával foglalkoznak, hogy milyen gyorsan következhet be változás a rozsdafertőzött búza terminális oxidációjában.

### A kísérlet anyaga és módszerei

Búza csíranövényeket (*Bánkúti 1201* és *F481* fajták) szokásos üvegházi viszonyok között neveltünk. Az első leveleket a fekete-rozsdá (*Puccinia graminis* var. *tritici* 21. fiziológiai rassz) uredospóra-szuszpenziójával fertőztük. A leveleket a betegség különböző fázisaiban szedjük le. A fertőzetlen, egészséges növényekről hasonló módon gyűjtöttünk mintákat. A kísérletek egyik részében a friss anyagot 0,15 mol foszfátpufferrel (pH 6,5) homogenizáltuk. Az aszkorbinsavoxidáz- és a polifenoloxidáz-aktivitást ezekben a nyers homogenizátumokban állapítottuk meg.



Az aszkorbinsavoxidáz-kísérleteket manometrikusan, Warburg-respirometerben végeztük. W a y g o o d [30] korábbi leírásának megfelelően, de egy titrálási módszert is alkalmaztunk, amely a homogenizátumokhoz adott aszkorbinsav-vesztés meghatározásán alapul [17]. A polifenoloxidáz szintén manometrikus, ill. titrimetrikus módszerrel határoztuk meg. A Warburg-edényekben a rendszer összeállítása a következő volt: 0,5 ml foszfát-puffer (pH 6,5) + 1,0 ml szövet-homogenizátum (1 g homogenizált levélszövet 10 ml desztillált vízzel) + 0,5 ml aszkorbinsav (24 mg/ml, neutralizált) az oldalkarban. A végső térfogat 2,0 ml. A polifenoloxidáz-kísérletekben az oldalkar 0,5 ml fenol-szubsztrátumot tartalmazott (0,02% katechol vagy 0,6% hidrokinnon). A kontrol-edényekbe hasonló mennyiségű felfőzött szövet-homogenizátum került. A méréseket sötét szobában, 30 °C-on végeztük.

A dietilditiokarbamattal (*dieca*) végzett kísérletekben az inhibitor a pufferelt homogenizátumokhoz adtuk és a rendszert 30 percig 20 °C-on inkubáltuk, mielőtt a szubsztrátumot is hozzáadtuk volna. Az utóbbi eljárás nélkül a *dieca* elbomlása a sorakerülő manometriás mérések alatt következik be és a keletkező gázalakú bomlástermékek nyomásváltozást idézve elő a rendszerben, zavarólag hatnak. Minthogy ennek az inhibitornak a hatása irreverzibilis, a *dieca*-kísérletekben az előkezelés tekinthető a legjobb módszernek [12].

Az inhibitorok in vivo alkalmazása esetén (azid, tiokarbamid) az oldatokat megfelelő pH-ra állítottuk be [11] és foszfát-pufferben oldva vákuum-infiltráció segítségével juttattuk az élő szövetekbe. Az infiltrált víz elpárologtatása után a levéldarabkákat a Warburg-edényekben ugyanazon az inhibitor-oldaton úsztattuk. Minthogy a *dieca* enyhén savanyú közegben (pH 5,0) erősen instabilis, az infiltráció után a levéldarabkákat 1-1½ óráig úsztattuk *dieca* oldaton és az oldatot minden 15 percben cseréltük. Kontrollként mindig a kísérleti edényével azonos pH-jú, foszfát-pufferrel infiltrált levéldarabkák O<sub>2</sub>-felvételét mértük.

### Kísérletek nyers homogenizátumokkal

#### Aszkorbinsavoxidáz-kísérletek

A roszdás levelek aszkorbinsavoxidáz-aktivitását a betegség előrehaladásának különböző fázisaiban állapítottuk meg. Egyidejűen azonos korú, egészséges növényekből készített homogenizátumokban is méréseket végeztünk. Az eredmények az 1. táblázatban találhatók. Amint a táblázatból látható, mind az egészséges, mind a beteg növények homogenizátumaiban aktív aszkorbinsavoxidálást észlelhettünk, a beteg szövetek extraktumaiban azonban az aktivitás jelentősen nagyobb volt. A betegség különböző stádiumaiban összehasonlítottuk az aszkorbinsav-enzimátikus eloxidálódásának a növekedését a respiráció növekedésével. Amint az 1. táblázatból látható, a respiráció és az aszkorbinsavoxidálás mértéke párhuzamos növekedést mutat. Ez a paralelitás azt jelzi, hogy a két folyamat között okozati összefüggés lehet.

Nyilvánvaló azonban, hogy a homogenizátumokban az aszkorbinsav eloxidálásának in vitro kimutatása még nem vehető azonosnak az aszkorbinsavoxidáz enzim in vivo funkcionálásával. Ezért további kísérleteket végeztünk annak az elgondolásnak bizonyítására, hogy a beteg szövetek végoxidálásában funkcionális változások következnek be. Először is figyelembe kellett vennünk, hogy az aszkorbinsavat több enzim is eloxidálhatja. Az aszkorbinsavoxidáz közvetlen működésén kívül számolni lehet a citokrómoxidáz és a polifenoloxidáz közvetett működésével is [8]. A citokrómoxidáz a citokróm c-n (esetleg b-n és c-n) keresztül,

a polifenoloxidáz pedig megfelelő fenolszubsztrátumokon keresztül oxidálhatja az aszkorbinsavat. A fenti eredmény (1. tábl.) tehát csak akkor egyértelmű, ha az aszkorbinsav oxidálásáról kimutatható, hogy nem a citokrómoxidáz, ill. a polifenoloxidáz működésének az eredménye.

Elsőnek a citokrómoxidáz szerepét kell tisztáznunk, különösen azért, mert a búzában a citokrómoxidáz jelenlétét [25, 27] többen is kimutatták. Feltételez-

1. táblázat

Egészséges és beteg búzalavelek aszkorbinsavoxidáz-aktivitásának és légzésaktivitásának összehasonlítása a betegség különböző fázisai alatt

| (1)<br>A fertőzés után<br>eltelt napok száma | (2)<br>Aszkorbinsavoxidázaktivitás. Oxidált aszkorbinsav<br>mg/l g szárazanyag/l óra |              |   | (3)<br>O <sub>2</sub> -fogyasztás a levelekben<br>Q <sub>O<sub>2</sub></sub> |              |  |
|--|--|--------------|---|--|--------------|--|
|  | (4)<br>Egészséges<br>(kontrol)   | (5)<br>Beteg | (6)<br>Enzimaktivitás a<br>kontrol %-ában | (7)<br>Egészséges<br>(kontrol)   | (8)<br>Beteg | (9)<br>Légzésaktivitás a<br>kontrol %-ában |
| 0  | 42   | 41           | 98  | 2,9  | 2,9          | 100  |
| 3—4  | 49   | 47           | 96  | 2,8  | 2,9          | 103  |
| 6—7  | 48   | 115          | 238                                       | 2,0  | 4,2          | 208  |
| 10—14  | 54   | 162          | 300                                       | 2,1  | 6,1          | 290  |

hető volt tehát, hogy esetleg a homogenizátumok endogén citokrómjain keresztül oxidálódik el az aszkorbinsav. Ennek azonban ellene mondanak a kísérleti eredmények. Ismeretes ugyanis, hogy az oxidált citokrómok redukálására a legspecifikusabb vegyület a p-feniléndiamin. Endogén, tehát kis mennyiségű citokrómok jelenlétében a lehetséges redukálószer (aszkorbinsav, fenolok, cisztein, p-feniléndiamin) közül a p-feniléndiamin fejt ki a legerősebb hatást, azaz komolyabb mértékben csak ez az elektrondonátor növeli a citokrómoxidáz tevékenysége révén a homogenizátumok O<sub>2</sub>-felvételét, citokróm c hozzáadása nélkül is. A 2. tábl. adatai szerint kísérleteinkben sem a fenolok, sem a p-feniléndiamin (0,02 mol) nem serkentették lényegesen a homogenizátumok O<sub>2</sub>-felvételét, az aszkorbinsav ezzel szemben nagy mértékben eloxidálható vegyületnek bizonyult. E kísérletek arra utalnak, hogy az aszkorbinsav oxidálását a homogenizátumokban nem a citokrómoxidáz végzi.

2. táblázat

Végoxidázok vizsgálata egészséges és fertőzött búzalavelek homogenizátumaiban

| (1)<br>A vizsgált rendszer   | (2)<br>mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -fogyás /l mg szárazanyag/l óra |                    |                  |
|--|---|--------------------|------------------|
|  | (3)<br>egészséges   | (4)<br>%-os gátlás | (5)<br>fertőzött |
| Homogenizátum (6) .....  | 0,3   | —                  | 1,3              |
| Homogenizátum + aszkorbinsav (7) .....                                 | 3,4   | —                  | 8,4              |
| Homogenizátum + aszkorbinsav + 10 <sup>-3</sup> mol<br>dieca (8) ..... | 0,3   | 92                 | —                |
| Homogenizátum + katechol (9) .....                                     | 0,4   | —                  | 1,2              |
| Homogenizátum + hidrokinon (10) .....                                  | 0,3   | —                  | 1,4              |
| Homogenizátum + aszkorbinsav + kate-<br>chol (11) .....                | 3,4   | —                  | 6,9              |
| Homogenizátum + p-feniléndiamin (12) ...                               | 0,4   | —                  | 1,5              |

A kapott eredmények értékének alátámasztása érdekében további kísérleteket végeztünk dieca-val, mint rézchelációs agenssel. A dieca 10<sup>-3</sup> molos kon-



centrációban valóban csökkentette az **a** aszkorbinsavat tartalmazó teljes rendszer  $O_2$ -felvételét, egészen a forralt kontrollok  $O_2$  fogyasztásának szintjére (2. táblázat). E kísérlet is Cu-tartalmú enzim működését igazolja.

### Polifenoloxidáz-kísérletek

Mint fentebb már említettük az **a** aszkorbinsav nemcsak közvetlenül az aszkorbinsavoxidáz által oxidálható el, hanem a polifenoloxidáz segítségével is [8, 9]. Mindkét enzim hatócsoporthoz **Cu**-t tartalmaz, ezért a *dieca*-kísérletek félreérthetetlen eredményt csak **a**ban az esetben adhatnak, ha a növények ugyanakkor nem tartalmaznak a polifenoloxidáz-csoporthoz tartozó enzimet. Ezért kísérleti anyagunkban a polifenoloxidáz jelenlétét is vizsgáltuk.

A polifenoloxidázokat tartalmazó szövetekben az intracelluláris struktúra dezorganizálása általában jelentős növekedést idéz elő az  $O_2$ -felvételben [8, 26]. Az egészséges növényekből készített homogenizátumok azonban kísérleteinkben nem mutattak semmi jelentős  $O_2$ -fogyasztást, ha az aszkorbinsav hozzáadására nem került sor (2. táblázat). A fertőzöttek mutattak némi oxigénabszorpciót de ez lényegesen kisebb volt, mint az élő szövetek respirációja. A homogenizátumokhoz adott pirokatechin és hidrokchinon többféle koncentrációban alkalmazva sem serkentette az  $O_2$ -felvételt, még akkor sem, ha egyidejűen aszkorbinsavat adtunk a rendszerhez, amint azt Szent-Györgyi és Vietorisz [26] ajánlotta a növényi fenolázokon végzett régebbi munkájában. (Ez utóbbi esetben nem mutatkozott nagyobb  $O_2$ -fogyasztási érték, mint amikor az aszkorbinsav egyedül került alkalmazásra). Ezek az eredmények határozottan kizárják a polifenoloxidázoknak, mint légzési rendszereknek részvételét mind az egészséges, mind a fertőzött búzacsíranövény-homogenizátumokban.

### In vivo kísérletek

Amint már előbb kiemeltük, egy légzési enzim jelenléte nem kapcsolatos szükségszerűen az enzim respirációbeli funkcionális szerepével. Ha azonban a szelektív inhibitorokkal in vivo kapott eredmények hasonló irányba mutatnak, az enzimnek a kérdéses anyagcserefolyamatokban való részvétele nagymértékben valószínűsíthető.

#### 3. táblázat

Végoxidázok in vivo vizsgálata egészséges és fertőzött búzalevelekkel

| (1)<br>A vizsgált rendszer             | (2)<br>mm <sup>3</sup> $O_2$ -fogyás (1 mg szárazanyag/1 óra) |                    |                  |                    |
|--|---|--------------------|------------------|--------------------|
|  | (3)<br>egészséges   | (4)<br>%-os gátlás | (5)<br>fertőzött | (6)<br>%-os gátlás |
| Élő szövetdarabok                      |   |                    |                  |                    |
| + $KH_2PO_4$ /kontrol (7) .....        | 2,2   | —                  | 6,3              | —                  |
| Élő szövetdarabok                      |   |                    |                  |                    |
| + $10^{-3}$ mol $NaN_3$ (8) .....      | 0,4   | 84                 | 0,9              | 86                 |
| Élő szövetdarabok                      |   |                    |                  |                    |
| + $10^{-3}$ mol <i>dieca</i> (9) ..... | 1,9   | 14                 | 2,7              | 58                 |
| Élő szövetdarabok                      |   |                    |                  |                    |
| + $10^{-2}$ mol tiokarbamid (10) ..... | 2,1   | 3                  | 6,3              | 0                  |

A 3. táblázatban vannak feltüntetve a szelektív inhibitorokkal végzett reprezentatív kísérletek eredményei. Látható, hogy mind az egészséges, mind



a fertőzött növények leveleinek respirációja egyenlő mértékben csökkenthető aziddal. Ez a körülmény arra mutat, hogy fémtartalmú enzimek vesznek részt mindkét növénycsoport terminális oxidációjában.

A *dieca*-val folytatott kísérletek azonban egészen más képet adnak. Az egészséges levelek  $O_2$ -fogyasztása alig befolyásolható ezzel a Cu-cheláló agenssel, a fertőzöttékét azonban hathatósan csökkenti. A tiokarbamid, a réztartalmú oxidázok specifikus mérge [8], valószínűleg permeabilitásnehézségek miatt, nem mutatott semmi inhibíciót.

A rozsdaferőzött és egészséges levelek aszkorbinsavoxidáló képessége is jelentős különbséget mutat. 0,01 molos aszkorbinsavoldaton úsztatott 1 g friss, fertőzött levél óránként 55 mg aszkorbinsavat oxidál el, az egészséges levelek azonban gyakorlatilag semmit.

Az *in vivo* kísérletek eredményei ezért jól megegyeznek az *in vitro* kísérletek eredményeivel, és arra utalnak, hogy a fertőzött növényekben a végoxidázok funkcionális változása  $Fe \rightarrow Cu$  irányú. A közölt eredmények azt mutatják, hogy az itt szereplő rézenzim az aszkorbinsavoxidáz.

### Az eredmények megbeszélése

Tárgyalást igénylő kérdés az, hogy a fertőzött növények légzési anyagcseréjében bekövetkezett változások valóban a gazdaszövetekben lejátszódó változásokhoz tartoznak-e, vagy esetleg a levelekben található gombahifák járulékos respirációjával magyarázhatók. Ezt a kérdést részleteiben megelőző közleményeinkben tárgyaltuk [6, 13] és más dolgozatok is tárgyalják [2, 3, 18, 21]. A hozzáférhető kísérleti adatokból és elméleti megfontolásokból az az általános következtetés vonható le, hogy az egész gazda-parazita komplex légzés-növekedésében a gomba respirációjának elhanyagolható szerepe van. Így a vizsgált funkcionális változások a gazdaszöveteknek tulajdoníthatók.

Fő problémaként tehát a fertőzött és egészséges növények respirációs útjainak megvilágítása tárgyalható. Az eddigi adatok alapján azt kell következtetni, hogy az egészséges búzában az oxidatív anyagcsere fő útja a trikarbonsav-ciklus, amely a citokróm-rendszerrel, mint végoxidáció-rendszerrel kapcsolódik. Az elmúlt évek vonatkozó irodalma csak ezt a nézetet támogatja. A búzalevelek légzés-folyamataiban a borostyánkősav-dehidrogenáz eminens szerepére előző dolgozatainkban mutattunk rá [6, 13]. Az enzim jelenlétét az  $O_2$ -felvétel nagy malonát-érzékenysége bizonyította. Minthogy a borostyánkősav oxidációjának egyetlen ismert mechanizmusa a citokróm-rendszeren át vezet, a borostyánkősav-dehidrogenáz működése a citokrómoxidáz jelenlétét is valószínűsíti. Továbbá a citokrómoxidáznak a búzában való jelenlétét újabban számos szerző demonstrálta [25, 27] és terminális oxidázként való szerepére számos növénycsoport esetében izotóp-kísérletekkel mutattak rá, köztük a *Gramineae*-ban is [5].

A búzalevelekben W a y g o d egy másik terminális oxidáz (aszkorbinsav-oxidáz) jelenlétét is kimutatta [30]. Eredményeit lényegében saját vizsgálataink is megerősítették. Az itt közölt, *in vivo* respirációs inhibitorokkal végzett kísérletekből azonban az következtethető, hogy az aszkorbinsavoxidáz inaktív formában, mint potenciális tartalékágens van jelen az anyagcsererendszerben. Az egészséges búzacsíranövények terminális oxidáza ezek szerint bizonyára a citokrómoxidáz.

A különböző dehidrogenázok (beleértve a borostyánkősav-dehidrogenáz-citokróm szisztémát) mennyisége bizonyos növényekben elegendő ahhoz, hogy az egész szövetlégzés rajtuk keresztül bonyolódjon le [19]. A fertőzött növények-



ben azonban kapacitásuk kevés lehet a háromszorosra növekedett légzés közvetítésére. Általában feltételezik, hogy az állati szövetekben a respiráció limitáló tényezője a borostyánkősav-dehidrogenáz-rendszer. Hasonló lehet a helyzet a búzában is. Malonátgátlásos vizsgálatainkból kiderül, hogy a beteg szövetek rendkívülien megnövekedett respirációja erősen malonátrezisztens. A stimulált légzés nagy része ezért új reakció-utakat követ. Ez jól megegyezik a jelen dolgozatban közöltekkel, t. i. azzal, hogy a vastartalmu oxidázok (pl. a borostyánkősav dehidrogenáz a citokrómrendszerrel kapcsolódva) részesedése a terminális oxidációban csökken, ha a növény fertőzötté válik és a parazitikusan stimulált respirációt főleg az aszkorbinsavoxidáz katalizálja.

A kapott adatok hathatós bizonyítékot szolgáltatnak arra nézve, hogy az aszkorbinsavoxidáz már az egészséges búzában is jelen van, de valószínűleg csak inaktív állapotban, mint potenciális enzim-forrás, és alkalomadtán aktiválódhat a fejlődés folyamán, pl. jarovizáció hatására [25], vagy parazita behatás eredményeképpen. Mindezek a változások néhány nap alatt következnek be.

(Egyébként környezeti tényezőknek a végoxidációra kifejtett hatásával Rubin és munkatársai foglalkoznak részletesen [20, 22]).

### Összefoglalás

Az egészséges búza-csíranövények respirációja főleg Fe-tartalmú enzimek közvetítésével bonyolódik le. A feketeteroszdával fertőzött szövetek megnövekedett  $O_2$ -felvétele ezzel szemben nagyon érzékeny a Cu-cheláló anyagokkal szemben. Polifenoloxidázok jelenléte nem mutatható ki a fertőzött búzacsíranövényekben, ehelyett igen aktív aszkorbinsavoxidáz-működés alakul ki. A fertőzött növények aszkorbinsavoxidáz-aktivitása parallel növekedik a respiráció-aktivitással. A leírt kísérletekből az következtethető, hogy a növények Fe-tartalmú oxidázai igen rövid idő alatt Cu-oxidázokkal cserélődnek fel a fertőzött szövetekben.

Érkezett: 1956. február 28.

### Irodalom

- [1] Akazawa, T. & Uritani, L.: Nature. **176**. 1071. 1955.
- [2] Allen, P. J.: Phytopath. **43**. 221. 1953.
- [3] Allen, P. J. & Goddard, D. R.: Amer. J. Bot. **25**. 613. 1938.
- [4] Bevers, H.: Amer. J. Bot. **40**. 91. 1953.
- [5] Daly, J. M. & Brown, A. H.: Arch. Biochem. and Biophys. **52**. 380. 1954.
- [6] Farkas, G. L. & Király, Z.: Physiol. Plant. **8**. 877. 1955.
- [7] Goddard, D. M. & Meeuse, B. J. D.: Ann. Rev. Plant. Physiol. **1**. 207. 1950.
- [8] Hill, R. & Hartree, E. F.: Ann. Rev. Plant Physiol. **4**. 115. 1953.
- [9] James, W. O.: Plant Respiration. Univ. Press. Oxford. 1953.
- [10] James, W. O.: Biol. Rev. **28**. 245. 1953.
- [11] James, W. O.: Ann. Rev. Plant Physiol. **4**. 59. 1953.
- [12] James, W. O. & Garton, N.: Expt. Bot. **3**. 310. 1952.
- [13] Király, Z. & Farkas, G. L.: Naturwiss. **42**. 213. 1955.
- [14] Király, Z. & Farkas, G. L.: Közöletlen adatok.
- [15] Kriukova, N. N.: Biohimija **14**. 538. 1949.
- [16] Mihlin, D. M. & Kolesnikov, P. A.: Biohimija **12**. 452. 1947.
- [17] Povolockaja, K. L. & Szedenko, D. M.: Biohimija. **20**. 88. 1955.
- [18] Pratt, R.: Science. **88**. 62. 1938.
- [19] Price, C. A. & Thimann, K. V.: Plant Physiol. **29**. 113. 1954.
- [20] Rubin, B. A. & Csetverikova, E. P.: Bioh. Plodov i ovoscs. **3**. 43. 1955.
- [21] Rubin, B. A. & Csetverikova, E. P. & Archihovszkaja, E. V.: Zsurn. obscs. biol. **16**. 106. 1955.
- [22] Rubin, B. A., Csernavina, I. A. & Miheeva, K. I.: Dokladi Akad. Nauk SSSR. **105**. 1039. 1955.
- [23] Simon, E. V.: Biol. Rev. **28**. 453. 1953.



- [24] Slater, E. C. & Lewis, S. E. : Biochem. J. **58**. 337. 1954.  
 [25] Sziszakjan, N. N. & Filippovics, J. J. : Zsurn. obses. biol. **14**. 215. 1953.  
 [26] Szent-Györgyi, A. & Vietorisz, K. : Biochem. Z. **233**. 236. 1931.  
 [27] Tombesi, L. : Ann. Sper. Agr. **9**. 855. 1955.  
 [28] Warburg, O. : Über den Stoffwechsel der Tumoren. Springer. Berlin. 1926.  
 [29] Warburg, O. : Naturwiss. **42**. 401. 1955.  
 [30] Waygood, E. R. : Canad. Jour. Res. C. **28**. 7. 1950.

## ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ОКСИДАЦИИ ПШЕНИЦЫ, ЗАРАЖЕННОЙ СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНОЙ

З. Кирай и Г. Л. Фаркаш

Сельскохозяйственный Исследовательский Институт Академии Наук Венгрии г. Мартонвашар (Венгрия)

### Резюме

По прежним опытам авторов (6, 13) в листьях пшеницы, заражённых ржавчиной и мучнистой росой во многих отношениях изменяется интермедиорный обмен веществ. В настоящей статье излагается изменение, вызванное болезнью в механизме терминальной оксидации.

Всходы пшеницы заражали уредоспорами стеблевой ржавчины *Puccinia graminis* и с использованием техники Варбурга изучили механизм терминальной оксидации в гомогенизированных образцах и *in vivo* при помощи ингибиторов.

Выяснилось, что гомогенизированные образцы и здоровых, и больных листьев ферментативным путем окисляют аскорбиновую кислоту. Степень окисления в гомогенизированных образцах заражённых тканей значительно сильнее. Результаты приведены в таблице 1. (1) Число дней, прошедших после заражения. (2) Активность оксидазы аскорбиновой кислоты в гомогенизированных образцах. Окисленная аскорбиновая кислота в мг на 1 гр сухого вещества за 1 час. (3) Потребление  $O_2$  в листьях,  $Q_{O_2}$ . (4) Здоровый, контроль. (5) Больной. (6) Активность ферментов в % от контроля. (7) Здоровый, контроль. (8) Больной. (9) Активность дыхания в % от контроля.

Данные таблицы 1 показывают, что во время процессов заражения, дыхание тканей хозяина в значительной степени увеличивается, и параллельно с этим, в гомогенизированных листьях увеличивается ферментативное окисление аскорбиновой кислоты. Это указывает на возможную связь между двумя процессами.

Показали, что окисление аскорбиновой кислоты нельзя приписывать действию ни цитохромоксидазы, ни полифенолоксидазы.

Так как прибавленные к гомогенизированным образцам фенола и р-фенилендиамина не стимулируют поглощение  $O_2$ , а аскорбиновая кислота вызывает значительную стимуляцию дыхания. Окисление аскорбиновой кислоты в гомогенизированных образцах проводит фермент, содержащий Cu, потому что диэтилдитиокарбамат (дизка) в большой степени тормозит окисление аскорбиновой кислоты. Результаты суммированы в таблице 2. (1) Изученная система. (2) Потребление  $O_2$  в  $mm^3$  на 1 гр сухого вещества за 1 час. (3) Здоровые. (4) % торможения. (5) Заражённые. (6) Гомогенизированные образцы. (7) Гомогенизированные образцы + аскорбиновая кислота. (8) Гомогенизированные образцы + аскорбиновая кислота +  $10^{-3}$  мол дизка. (9) Гомогенизированные образцы + катэхол. (10) Гомогенизированные образцы + гидрохинон. (11) Гомогенизированные образцы + аскорбиновая кислота + катэхол. (12) Гомогенизированные образцы + р-фенилендиамин.

Опыты *in vivo* тоже показывают, что оксидаза аскорбиновой кислоты является ферментом, катализирующим дыхание.  $NaN_3$  в одинаковой степени тормозит дыхание и здоровых, и заражённых тканей. Такое обстоятельство указывает на участие фермента, содержащего металл. Дизка снижает в значительной степени только паразитогенное дыхание. Это тоже показывает, что действующей группой фермента является медь. Речь не может идти о полифенолоксидазе, потому что тиокарбамид, который тормозит полифенолазы, совсем не действует на дыхание. Дыхание здоровых участков тканей, плавающих на растворе аскорбиновой кислоты практически не стимулируется аскорбиновой кислотой, но у заражённых вызывает значительное повышение дыхания. Опыты *in vivo* приведены в таблице 3. (1) Изученная система. (2) Потребление  $O_2$  в  $mm^3$  на 1 гр сухого вещества за 1 час. (3) Здоровые. (4) % торможения. (5) заражённые. (6) % торможения. (7) живые участки тканей +  $KH_2PO_4$ , контроль. (8) Живые участки тканей +  $10^{-3}$  мол  $NaN_3$ . (9) Живые участки тканей +  $10^{-3}$  мол дизка. (10) Живые участки тканей +  $10^{-2}$  мол тиокарбамид.



Значит, эти результаты указывают на то, что в здоровой пшенице терминальную фазу дыхания катализируют Fe-ферменты, а сильное паразитогенное дыхание происходит главным образом при участии Cu-фермента (оксидазы аскорбиновой кислоты).

## Untersuchungen über den Mechanismus der Endoxydation des rostbefallenen Weizens

Z. KIRÁLY und G. L. FARKAS

Forschungsinstitut für Landwirtschaft der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Martonvásár

### Zusammenfassung

In früheren Versuchen der Verfasser wurde nachgewiesen [6, 13], dass der Reaktionsweg des intermediären Stoffwechsels in kranken, mit *Puccinia graminis* und *Erysiphe graminis* infizierten Weizenblättern in vieler Hinsicht verändert wird. Diese Mitteilung befasst sich mit den Änderungen, die durch den Rostbefall im Mechanismus der Endoxydation hervorgerufen werden.

Weizenkeimlinge wurden mit Uredosporensuspensionen des Schwarzrostes infiziert und die Enzymsysteme der Endoxydation unter Anwendung der gewöhnlichen Warburg-Technik in Homogenisaten bzw. in vivo, mittels verschiedener Atmungsinhibitoren untersucht.

Es zeigte sich, dass Ascorbinsäure sowohl durch die Homogenate gesunder Blätter, wie auch durch die der kranken Organe enzymatisch schnell oxydiert wird. Die Aktivität dieser Reaktion war jedoch in Homogenisaten aus kranken Geweben wesentlich höher. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst. (1) Zahl der nach der Infektion vergangenen Tage. (2) Aktivität von Ascorbinsäureoxydase in Homogenisaten. Oxydierte Ascorbinsäure in mg/l g Trockensubstanz/l Std. (3) O<sub>2</sub>-Verbrauch der Blätter Q<sub>O<sub>2</sub></sub> (4) Gesund, Kontrolle (5) Gesund, Kontrolle (8) Krank (9) Atmungsintensität in Prozenten der Kontrolle.

Die Angaben der Tabelle 1 weisen also darauf hin, dass im Laufe der Ausbreitung des Infektionsprozesses die Atmungsintensität der Wirtsgewebe beträchtlich erhöht wird. Gleichzeitig ist ein Anstieg in der enzymatischen Oxydierbarkeit der Ascorbinsäure in Gewebhomogenisaten zu beobachten, der mit der erwähnten Erhöhung der Atmungsintensität der Wirtsgewebe parallel vor sich geht. Die Parallelität zwischen diesen zwei Prozessen lässt auf einen ursächlichen Zusammenhang schliessen.

Es wurde nachgewiesen, dass die beobachtete enzymatische Oxydation der Ascorbinsäure nicht der Tätigkeit der Cytochromoxydase oder Polyphenoloxydase zuzuschreiben ist. Verschiedene Phenole und p-Phenylendiamin können nämlich die O<sub>2</sub>-Aufnahme der Homogenisate nicht steigern, während Ascorbinsäure in den *in vitro* Systemen eine beträchtliche Atmungssteigerung verursacht. An der Oxydation der Ascorbinsäure in Gewebhomogenisaten ist ein Cu-Enzym beteiligt, da Diethyldithiocarbamat (Dieca) die Dehydrierung der Ascorbinsäure stark beeinträchtigen kann. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 angeführt. (1) Das untersuchte System (2) O<sub>2</sub>-Verbrauch in mm<sup>3</sup>/lg Trockensubstanz/l Std. (3) Gesund (4) Hemmung in % (5) Krank (6) Homogenisat (7) Homogenisat + Ascorbinsäure (8) Homogenisat + Ascorbinsäure + 10<sup>-3</sup> mol. Dieca (9) Homogenisat + Pyrocatechin (10) Homogenisat + Hydrochinon (11) Homogenisat + Ascorbinsäure + Pyrocatechin (12) Homogenisat + p-Phenylendiamin.

Die mit lebenden Gewebeschnitten durchgeführten Untersuchungen liefern ähnlicherweise Beiträge dafür, dass die parasitogen gesteigerte Atmung über die Ascorbinsäureoxydase geleitet wird. Na<sub>3</sub> hemmt die O<sub>2</sub>-Aufnahme der gesunden und der kranken Gewebe in gleichem Masse. Dieser Umstand weist darauf hin, dass Metallproteide als Endoxydasen fungieren. Eine Behandlung mit Dieca entfaltet jedoch nur auf die O<sub>2</sub>-Aufnahme der infizierten Blätter eine stärkere hemmende Wirkung. Dieses letztere Ergebnis deutet auf die katalytische Rolle irgendwelcher Cu-Proteide. Polyphenolase kommt nicht in Betracht, da die Phenole die Atmung gar nicht beeinflussen.

Gewebeschnitte aus gesunden und kranken Weizenblättern wurden in Warburggefässen in Ascorbinsäurelösung suspendiert. Dabei ergab sich, dass die Ascorbinsäure nur in den infizierten Blättern eine starke Atmungssteigerung bewirkt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst. (1) Das untersuchte System (2) O<sub>2</sub>-Verbrauch in mm<sup>3</sup>/l g Trockensubstanz/l Std. (3) Gesund (4) Hemmung in % (5) Krank (6) Hemmung in % (7) Gewebeschnitte + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Kontrolle (8) Gewebeschnitte + 10<sup>-3</sup> Na<sub>3</sub> (9) Gewebeschnitte + 10<sup>-3</sup> mol. Dieca (10) Gewebeschnitte + 10<sup>-2</sup> mol. Thioharnstoff.

Die mitgeteilten Ergebnisse brachten also den Beweis dafür, dass die terminale Phase der Oxydation in dem gesunden Weizen durch Fe-Enzyme, die parasitogen gesteigerte Atmung aber vorwiegend durch Teilnahme der Ascorbinsäureoxydase zu Ende geführt wird.